Omaggio di Gorini

BG 439

RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali.
Estratto dal vol. VII, serie 6ª, 1º sem., fasc. 8 — Roma, aprile 1928.

Batteriologia. — *Cultura ascendente e dissociazione microbica* [1]. Nota di COSTANTINO GORINI, presentata [2] dal Socio O. MATTIROLO.

Sono due capitoli di batteriologia nei quali sono pioniere:

Cultura ascendente o rampicante. – Nel 1903 [3], avendo scoperto presso alcuni batteri (B. del tifo, Proteus, ecc.), la proprietà di arrampicarsi attivamente dai liquidi sulle superfici solide di nutrizione, proposi la *cultura ascendente* sull'agar obliquo quale mezzo per selezionare questi batteri dal materiale che li contiene insieme con altri. Questo metodo è stato utilizzato otto anni dopo (1911) da Choukevitch [4] (al quale è spesso erroneamente attribuito) e da Cantù [5], e in seguito da Metchnikoff [6], Bertrand [7], Puntoni [8], Tassinari [9] e da altri per la ricerca del Proteus; io stesso l'ho esteso poscia [10] all'isolamento di vari altri germi, che interessano la microbiologia medica, agraria e industriale, dalle feci, dalle acque, dal terreno, dal latte, dalla birra, ecc.; inoltre l'ho impiegato per studi di biologia microbica relativi alla mobilità, alla ciliatura, ecc., seguito in ciò da altri osservatori [11].

(1) Lavoro eseguito nel Laboratorio di Batteriologia del R. Istituto Superiore Agrario di Milano.

(2) Nella seduta del 18 marzo 1928.

(3) « Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e Lett. », 1903, 36°.

(4) « Annales Pasteur », 1911, 25°.

(5) Ibidem.

(6) Ibidem., 1914, 28°.

(7) Ibidem.

(8) « Annali d'Igiene », 1916, 26°.

(9) « Lo Sperimentale », 1927, 81°.

(10) « Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e Lett. », 1917, 49°.

(11) « Atti della IV Conferenza Internazionale di Pedologia », Roma, maggio 1924.

Dissociazione microbica. - Nel 1921 [1] colle mie ricerche sulla eterogeneità e sulle mutazioni fisiologiche dei fermenti latticoproteolitici (che ora vanno sotto il nome di *acidoproteoliti Gorini*) per divergenze individuali, sono stato fra i primi contemporaneamente a Arkwright [2] e De Kruif [3] a svelare consciamente il processo di *dissociazione microbica spontanea* denunciandolo come un fenomeno naturale dovuto alla coesistenza normale di individui dotati di differente attività nelle culture pure di una medesima specie. E ancora oggi le mie ricerche su questo processo, che va diventando un principio fondamentale della microbiologia, rivestono un' importanza peculiare perchè riguardano le proprietà fisiologiche, biochimiche dei germi, mentre le ricerche degli altri AA., come rileva l'Hadley nella sua recente ampia monografia sull'argomento e come egli stesso ebbe a scrivermi privatamente [4], riguardano le proprietà morfologiche o le proprietà patogene e serologiche.

Ora io ho voluto verificare se, nel processo dissociativo degli acidoproteoliti, alle modificazioni biochimiche corrispondessero modificazioni morfologiche, approfittando del *Bacillus acidificans presamigenes casei* che nei trapianti periodici in latte mi ha dato frequenti esempi di mutazione con dissociazione, onde ne conservo nella mia collezione tre ceppi madre, che coagulano e peptonizzano il latte con reazione acida, accanto a tre ceppi figlia che peptonizzano il latte senza previa coagulazione in causa di una più debole produzione di acidità. Di tutt'e sei ho allestito culture isolanti parallele in gelatina a piatto, ottenendo i seguenti risultati, che riuscirono sensibilmente uguali per i ceppi madre fra loro e per i ceppi figlia fra loro, differenziando soltanto leggermente per il grado di compattezza e opacità delle colonie. I ceppi madre hanno dato luogo a tre tipi di colonie tutt'e tre liquefacienti, ma diversi *fin dall'inizio dello sviluppo e in tutta la colonia* per struttura microscopica (50 diametri) e macroscopica; e cioè: un tipo assai predominante a struttura granulosa, un tipo a struttura filamentosa e un tipo a struttura mista. Invece i ceppi figlia hanno dato luogo tutti unicamente al tipo di colonie a struttura filamentosa. Adunque, mentre gli stipiti madre risultano costituiti da elementi eterogenei, gli stipiti figlia risultano costituiti da elementi omogenei; degno di nota il fatto che dei vari tipi costituenti gli stipiti madre, uno solo e precisamente uno dei non

(1) «Rend. R. Acc. Lincei». Nota presentata il 16 gennaio 1921 e pubblicata nel vol. XXX, fasc. 10° - «Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e Lett.», 1921, 54°, seduta del 14 aprile 1921.

(2) «Journ. Pathol. Bacteriol.», 1921, 24°.

(3) «Journ. Exper. Med.», 1921, 33°.

(4) PHILIP HADLEY, *Microbic Dissociation*, Chicago, 1927. In data 24 dicembre 1927, l'Hadley mi scriveva: «Since writing my Monograph I have often found cause to regret the fact of important omissions in my bibliography Your valuable contribution is among this number. In your case, I am especially sorry, because you have dealt with *biochemical variations*; and we need more instances of this sort. My thesis did not receive such good support in this category of reactions».

predominanti, il filamentoso, si sia ritrovato a formare tutt'e tre gli stipiti figlia che sono originati da mutazione spontanea. Ciò induce a ritenere che il tipo granuloso sia il tipo madre da cui deriva il tipo filamentoso verosimilmente attraverso il tipo misto. Questa concezione trova appoggio in quest'altro ordine di osservazioni. I due tipi granuloso e filamentoso, accuratamente isolati mediante una serie di piatte in gelatina, conservarono i caratteri della rispettiva struttura nei trapianti in brodo e segnatamente nelle infissioni in gelatina e in agar; però, lasciando invecchiare le colonie sulle piatte di agar, ho notato che, mentre il tipo filamentoso si espande mantenendo invariata la propria struttura, il tipo granuloso in capo a 6-8 giorni mostra ai suoi margini una evidente trasformazione verso la struttura filamentosa, la quale poi si trasmette nei trapianti in gelatina e in agar. Si tratta adunque di una vera mutazione che si verifica dal tipo granuloso al filamentoso e viceversa. Ciò va d'accordo colle osservazioni degli AA., secondo i quali, nei due tipi principali di colonie che si riscontrano con sorprendente parallelismo presso la maggioranza delle specie batteriche e che vengono convenzionalmente denominate S e R, il processo dissociativo si compie comunemente sempre in una medesima direzione e precisamente da S verso R; soltanto eccezionalmente, difficilmente o per via artificiale, il processo può compiersi in senso inverso. A vero dire, nelle mie osservazioni sulle mutazioni fisiologiche nelle culture degli acidoproteoliti in latte ho accertato anche, sebbene più raramente, casi di retromutazione, cioè di reversione spontanea; forse perchè, come pensa l'Hadley, le dissociazioni sono più facili e più attive nelle culture liquide? Comunque sia, senza voler qui stabilire raffronti fra i miei due tipi e i tipi S ed R, la cui terminologia si riferisce a caratteri opposti di morfologia (S = *smooth*; R = *rough*) e di fisiologia (S = sensibile; R = resistente all'autolisi), mette conto far rilevare che una certa corrispondenza esiste nel fatto che il tipo granuloso presenta caratteri di instabilità al pari del tipo S, mentre il tipo filamentoso presenta caratteri di stabilità al pari del tipo R. Noterò inoltre che gli AA. descrivono spesso anche un tipo intermedio O che corrisponderebbe al mio tipo a struttura mista.

Dal punto di vista biochimico il tipo granuloso mostra una attività più marcata; esso liquefa la gelatina più rapidamente e profondamente; esso coagula il latte in 24 ore a 37° C. con un'acidità Soxhlet di 16°, che al terzo giorno sale a 25° con digestione del coagulo, mentre il tipo filamentoso raggiunge solamente al terzo giorno un'acidità Soxhlet di 13°, e peptonizza senza previa coagulazione.

Anche dal punto di vista della morfologia cellulare i due tipi presentano differenze importanti; entrambi sono formati da bacilli a estremità arrotondate, di una larghezza media da 0.8 a 0.9 μ, di una lunghezza media di 3 μ, più accentuata nel tipo filamentoso; essi producono endospore elissoidali lunghe 0.9-1.4 μ e larghe 0.6-0.9 μ, più numerose nel tipo gra-

nuloso. Ma le differenze più sensibili stanno nell'aggruppamento e nella mobilità; nel tipo granuloso gli elementi sono generalmente isolati o a due, raramente in serie di 3-7, mentre nel tipo filamentoso gli elementi sono riuniti in serie numerose di 30, 40 fino ad un numero illimitato di articoli i quali rimangono incatenati anche sotto lo stemperamento; gli individui isolati o binati sono mobilissimi, ma essi diventano sempre meno mobili quanto più numerosa è la serie, finchè le catene lunghe sono immobili o al più presentano le estremità dotate di movimenti di oscillazione e di flessilità.

Tale divario di mobilità mi ha suggerito di tentare l'applicazione della cultura rampicante alla dissociazione artificiale del ceppo madre, ottenendone esito del tutto positivo. Entro 18-24 ore a 37° C. la superficie dell'agar obliquo era invasa pressochè uniformemente fino a notevole altezza da una sottile patina; prelevatane una piccola porzione dalla zona più alta, che al microscopio appariva costituita essenzialmente da cellule isolate o binate mobili, ne allestii una seconda cultura rampicante; ripetei l'operazione per un paio di volte finchè mi fui convinto, mediante piatte in gelatina, che avevo ricavato il tipo granuloso allo stato di purezza. Qui mi torna acconcio rincalzare il mio avvertimento sulla necessità di non confondere l'ascesa precoce attiva coll'ascesa tardiva, dirò così, passiva dei germi sull'agar inclinato; infatti nelle suddette culture rampicanti ben presto la patina ascendente mostrava di contenere anche individui immobili in catena del tipo filamentoso, i quali verosimilmente erano ivi pervenuti più che altro per continuità di sviluppo, per espansione dell'orlicino di cultura che si forma sull'agar con qualsiasi germe ancorchè non arrampicante presso il margine dell'evaporantesi acqua di condensazione.

Tutto ciò mi ha ricordato le mie ricerche (1) sopra un gruppo di batteri che hanno affinità morfologiche col *B. acidificans presamigenes casei* e che nella cultura rampicante invadono rapidamente l'agar anche fino all'estremità superiore, sebbene vi si presentino ordinariamente immobili. Nel mio precedente lavoro ho dimostrato che se però si ha cura di esaminare la cultura al primissimo inizio di sviluppo (talora solamente dopo 8-12 ore) si arriva a sorprendere una mobilità transitoria in individui corti, isolati, ai quali tengon dietro bentosto filamenti e catene immobili; ne ho concluso che questi batteri hanno una mobilità limitata alle prime ore di sviluppo, cioè allo stato di giovinezza. Vogliasi considerare che si tratta di quel gruppo di bacilli sporigeni del fieno e delle patate (*B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. mycoides*, *B. megatherium*, *B. carotarum*, ecc.), sulla cui mobilità si sono intavolate tante discussioni; io vi ho aggiunto anche il *B. anthracis* avendolo constatato talvolta rampicante confermando le osservazioni di Toussaint (2),

(1) «Rend. R. Ist. Lomb. Sc. e Lett.», 1917, 49°.
(2) «C. R. Ac. Sciences», 1877.

Nicolle (1), Dupond (2), Carpano (3) ed altri sulla sua transeunte fugace mobilità. Ora io ho ripetuto le mie ricerche dal punto di vista della dissociazione culturale secondo il metodo sopraindicato; ne ho ottenuto risultati analoghi; i primissimi rampicatori hanno dato luogo a colonie rotonde, compatte, *granulose*, diverse dalle colonie irregolari, sparse, *filamentose* (*caput medusae* e simili) che sono tipiche di questo gruppo di microbi e che derivano per dissociazione dalle colonie granulose in seguito ad invecchiamento sull'agar.

Riserbandomi di ritornare sull'argomento e di estendere le indagini ad altri gruppi di batteri rampicanti, quali il gruppo del B. Coli-tifo, il gruppo del Proteus, ecc., vengo, per il momento, alle conclusioni seguenti:

I. Nelle dissociazioni naturali degli acidoproteoliti, quali il *Bacillus acidificans presamigenes casei*, alle manifestazioni biochimiche si accoppiano manifestazioni morfologico culturali, le quali sono caratterizzate particolarmente: *a*) da variazioni nelle colonie di cui si distinguono due tipi principali: un tipo madre granuloso instabile e un tipo figlia filamentoso stabile, che trovano una certa corrispondenza coi tipi di colonie S e R degli AA.; *b*) da variazioni nell'aggregazione e nella mobilità cellulari, che possono essere controllate mediante la cultura ascendente atta a selezionare il tipo granuloso più attivo e mobile.

II. La cultura ascendente o rampicante permette di svelare presso un gruppo di bacilli sporigeni una mobilità transitoria ristretta a stadî iniziali di sviluppo, i quali danno luogo a colonie di tipo diverso dal tipo caratteristico delle rispettive specie, di guisa che i fenomeni di dissociazione microbica appariscono legati a fasi differenti del ciclo vitale, donde l'instabilità delle culture.

III. La cultura arrampicante da me ideata si presta non solamente alla separazione di specie diverse, ma altresì alla dissociazione di una medesima specie microbica.

(1) MACÉ, *Traité de Bactériologie*, 1912.
(2) «Thèse de Nancy», 1905.
(3) «Moderno Zojatro», 1915, n. 11.

Roma, 1928 — Dott. G. Bardi, tip. della R. Accad. dei Lincei.